

Quantum Blue®
Calprotectin Extended

Quantitative
Lateral Flow Assay

LF-CALE25 25 tests

Revision date: 2015-02-03

BÜHLMANN LABORATORIES AG
Baselstrasse 55
CH - 4124 Schönenbuch, Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

ENGLISH

INTENDED USE

BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended assay is an immunoassay designed for the quantitative determination of Calprotectin concentrations in human stool samples (ref.1-6) in combination with the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.
For professional use only*.
*Canada, Taiwan: For laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test is designed for the selective measurement of Calprotectin antigen by sandwich immunoassay. A monoclonal capture antibody (mAb) being highly specific for Calprotectin is coated onto the test membrane. A second monoclonal detection antibody conjugated to gold colloids is deposited onto the conjugate release pad and released into the reaction system after addition of the extracted and diluted stool sample. The Calprotectin/anti-Calprotectin gold conjugate binds to the anti-Calprotectin antibody coated on the test membrane (test line; test band) and the remaining free anti-Calprotectin gold conjugate binds to the goat anti-mouse antibody coated on the test membrane (control line; control band). The signal intensities of the test line and the control line are measured quantitatively by the BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Comments
Test Cassette	25 pieces	B-LFCALUS-TC	vacuum-sealed in a foil bag
Extraction buffer	1 bottle 125 mL	B-CAL-EX	Ready to use
RFID Chip Card	1 piece	B-CALE-RCC	**White** plastic card
RFID Chip Card	1 piece	B-CALE-RCC720	**Green** plastic card

Table 1

REAGENTS & MATERIAL SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal Extraction Devices

Fecal Extraction Devices described below are not delivered with the kit and either of them **has to be ordered** with the kit.

CALEX® Cap Device	50 or 200 tubes filled with 5 mL extraction buffer, ready to use	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubes consisting of spatulas and base caps	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip. Filled with 1.3 mL extraction buffer, ready to use	B-CAL-SO50

Table 2

Controls

Controls for BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CALE25 can be ordered separately.

Controls Low* / High*	2 vials, 0.5 mL	B-CALE-CONSET	Ready to use

Table 3

* Lot specific concentration of Calprotectin

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

All kit components are stable at 2-8°C until the expiration date printed on the labels.

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- None of the reagents of this test contains components of human origin.
- Patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- All reagents and test samples must be equilibrated to room temperature (18-28°C) before starting the assay. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Test Cassettes cannot be re-used.

Test Procedure

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, handled or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- The Quantum Blue® Reader must be switched on and programmed for the Quantum Blue® Calprotectin assay: B-CALE-RCC or B-CALE-RCC720, before starting the assay (see Quantum Blue® Reader Manual).
- Use the RFID Chip Card in order to change lot-specific test parameters.
- Patient samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- In order to receive reliable and quantitative results it is important to homogenize the stool sample entirely in the Extraction Device.
- Diluted samples should be used within several hours and cannot be stored for a longer time period.
- With BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, it is important to centrifuge the extracts before storage. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 3’000 x g. After centrifugation the supernatant must be transferred into a fresh storage tube. With CALEX® Cap Device you can store the extracts directly with the device. For re-use/ re-measurement of the extracts see step 2 under the chapter Assay Procedure.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Vortex mixer for stool extraction
- Precision pipettes with disposable tips: 10-200 µl and 1 ml
- Centrifuge
- 5 ml polypropylene or polystyrene tubes for dilution of the extracts
- Timer (optional)
- Quantum Blue® Reader available from BÜHLMANN (order code: BI-POCTR-ABS)
- Soft tissues or blotting paper

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

If the Extraction Devices are used (refer to Table 2), less than 1 g of native stool will be required.
Collect stool samples into plain tubes. The samples can be stored refrigerated at 2-8°C for at least 6 days.
The extracts are stable for at least 7 days at 2-8ºC and for at least 24 months at ≤ -20ºC.
Important: The sample must be collected without any chemical or biological additives in the collection device.

ASSAY PROCEDURE

The Assay Procedure consists of three steps:

1. **Extraction of stool samples:**
   The extraction is described in the instruction for use delivered with the respective extraction devices.
2. **Sample processing:**

- Smart Prep or ScheBo® Quick Prep™: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes. Dilute the supernatant 1: 10 with extraction buffer (e.g. 50 µL extract and 450 µL extraction buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28°C prior to proceeding to the next step (step no. 3).
- CALEX® Cap Device: After extraction, let the stool extract settle for 10 minutes with the white head of the device down. Unscrew the blue cap. The supernatant can be used without further dilution in the lateral flow assay.

3. **Lateral Flow Assay Procedure and Readout:**
   Two alternative methods can be loaded from the respective RFID Chip card: B-CALE-RCC or B-CALE-RCC720. Select one of the RFID chip cards before starting the experiments. Load the test method from the RFID Chip Card.

3.1. Method <B-CALE-RCC720> with internal timer

- Use the green plastic card.
- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Reader.
- Add 60 µl of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Close the cassette holder and start the measurement by pressing the start button.
- The scan starts automatically after 12 minutes (720 seconds).

3.2. Method <B-CALE-RCC> without internal timer

- Use the white plastic card.
- Add 60 µl of diluted stool extract onto the sample loading port of the test cassette.
- Incubate for 12 minutes +/- 1 minute
  (set a timer manually).
- Load the test cassette onto the test cassette holder of the Reader.
- Scan the cassette with the Quantum Blue® Reader by pressing the start (<ENTER>) button immediately.

Remark: Please refer to the Quantum Blue® Reader Manual to learn about the basic functions and how to initialize and operate the Reader, especially how to select test methods, and how to load lot specific parameters from the RFID Chip Card in order to get the samples measured.

QUALITY CONTROL

- If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents and iii) storage and incubation conditions.
- Result of the self-test of the Quantum Blue® Reader performed at startup of the instrument has to be valid.

VALIDATION OF RESULTS

- For a valid test result, the Control Line (C) must be visible in any case (see Figures 1A and 1B). It is used as functional test control only and cannot be used for the interpretation of the Test Line (T). If the Test Line (T) is not detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1A), the concentration of Calprotectin present in the stool sample is below the detection limit. If a Test Line (T) is detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1B), the Calprotectin concentration present in the stool sample is calculated by the Quantum Blue® Reader.
- If only the Test Line (T) is detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1C), the test result is invalid and the Calprotectin assay has to be repeated using another test Cassette.
- If neither the Control Line (C) nor the Test Line (T) are detectable after 12 minutes of incubation time (Figure 1D), the test result is invalid and the Calprotectin assay has to be repeated using another test Cassette.
- As the Quantum Blue® Reader allows a quantitative evaluation of the Test (T) and Control (C) Lines, an additional validity check of the Control Line (C) is undertaken. If the signal intensity of the Control Line (C) is below a threshold after 12 minutes of incubation time, the test result is also invalid and the Calprotectin High Range assay has to be repeated using another test Cassette.

STANDARDIZATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

- The Lateral Flow Assay is calibrated with the BÜHLMANN fCAL™ ELISA (order code: EK-CAL).
- The BÜHLMANN Quantum Blue® Reader uses a lot-specific standard curve to calculate the Calprotectin concentration. The assay range is between 30 and 1000 µg/g.
- For quantitative measurements, unknown samples reading above 1000 µg/g can be re-tested in the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range assay (order code: LF-CHR25).

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure human Calprotectin in extracted stool samples.
- Fecal Calprotectin values can be used as supplementary data available to the physician in establishing a diagnosis.
- A Calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin rapid assay can be confirmed by measuring other biomarkers (such as C-Reactive Protein) or by repeating the Calprotectin test (with BÜHLMANN fCAL™ ELISA or using a second test cassette) and comparing to the CDAI score and the clinical status of the patient, before any clinical and/or therapeutic decision is made.
- During therapy follow-up, a Calprotectin test result obtained with the BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended assay can be interpreted by comparing the result with previous ones and in the context of the patient's clinical picture.

EXPECTED VALUES

Estimation of fecal Calprotectin is a reliable and simple way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases.
The following data were established with the BÜHLMANN fCAL™ (order code: EK-CAL). In a clinical study, 401 symptomatic consecutive patients scheduled for colonoscopy were investigated (Table 18).
Endoscopy examination showed 273 patients with functional diseases, whereas 128 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulceration, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases).
A clinical cut-off at 50 µg/g was determined by ROC curve analysis (AUC: 0.935). By applying this cut-off for differentiation between organic and functional diseases, a clinical sensitivity of 84.4% and a specificity of 94.5% can be reached. The suggested cut-off level for adults (50 µg/g) can be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (ref.7). Although fecal Calprotectin levels from adults and children are reported comparable in general, levels of newborns can be significantly increased (ref.6).
These data support the following recommendation for interpretation of results:

Values below 50 µg/g:
Calprotectin values <50 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patient- samples with low levels are likely not to be in need of further invasive procedures to determine the inflammation cause (ref. 4).

Elevated values between 50 and 200 µg/g:
Calprotectin values between 50 and 200 µg/g can represent mild organic disease such as inflammation caused by NSAIDs, mild diverticulitis and IBD in remission phase. The low inflammatory response shown within this range may suggest repeating the measurement and performing further investigations.

Elevated values above 200 µg/g:
Calprotectin values >200 µg/g are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative and curative procedures by specialists are suggested.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of Blank (LoB): <20 µg/g calprotectin**.**

Limit of Detection (LoD): <30 µg/g calprotectin.

Limit of Quantification (LoQ):
Lower LoQ: ≤30 µg/g calprotectin
Upper LoQ: ≥1000 µg/g calprotectin.
The LoQ has been established with 14 stool samples. The resulting precision profile is shown in Figure 2. The limit of quantification corresponds to the concentration of Calprotectin with an imprecision below 25% CV allowing a quantitative measurement within the range from 30 (lower LoQ) to 1000 µg/g (upper LoQ).

Linearity: The results showed linearity within the indicated measuring range of 30 to 1000 µg/g of the Quantum Blue® Calprotectin Extended assay for all samples.

Recovery: The recovery varied between 90.6% - 101.8%.

Repeatability: **20.1% mean CV.** The repeatability was calculated from 8 stool extract samples. The mean values of three different lots of Test Cassettes are presented in (Table 19). The repeatability varied between 17.9% -23.9 % CV.

Inter-lot Precision: 20.8% mean CV. The inter-lot precision of the Quantum Blue® Calprotectin Extended assay was calculated from 8 stool extract samples containing between 30 and 1000 µg/g calprotectin. The inter-lot data of the samples varied from 16.1% to 24.1% CV.

Method Comparison: R^2 = 0.94; y=1.05-3.91 µg/g
50 stool samples exhibiting calprotectin concentrations within the indicated measuring range of the Quantum Blue® Calprotectin Extended assay were analyzed according to the assay procedure and compared with the values obtained by the BÜHLMANN fCAL™ (order code: EK-CAL). The correlation data are illustrated in Figure 3.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der Quantum Blue® Calprotectin Extended assay von BÜHLMANN ist ein Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Calprotectin Werten in humanen Stuhlproben (ref. 1-6). Der Test wird in Kombination mit dem Quantum Blue® Reader angewandt.
Nur für zur Anwendung durch medizinisches Fachpersonal geeignet.*
*Canada, Taiwan: Nur für Laborzwecke geeignet.

PRINZIP DER METHODE

Das Testprinzip beruht auf der selektiven Messung von Calprotectin mittels Sandwich Immunoassay. Ein monoklonaler Fangantikörper (mAk), der hoch spezifisch für Calprotectin ist, wird auf eine Testmembran gebunden. Ein zweiter monoklonaler Nachweisantikörper, welcher mit Goldkolloide konjugiert ist, wird auf dem „Conjugate Release Pad" aufgebracht. Nach der Zugabe der extrahierten und verdünnten Stuhlprobe wird er in das Reaktions-System freigesetzt. Der Calprotectin/Anti-Calprotectin-Goldkonjugat Komplex bindet an den auf der Membran gebundenen Anti-Calprotectin Antikörper (Testbande). Das verbleibende nicht gebundene Anti-Calprotectin Goldkonjugat wird von einem Ziege-Anti-Maus Antikörper gebunden, welcher ebenfalls auf die Membran gebunden wurde (Kontrollbande). Die Signalintensität der Testbande und der Kontrollbande wird durch den Quantum Blue® Reader quantifiziert.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Kommentar
Test Kassette	25 Stück	B-LFCALUS-TC	In einem Folienbeutel vakuumdicht
Extraktionspuffer	1 Flasche 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
RFID Chip Karte	1 Stück	B-CALE-RCC	**Weisse** Plastikkarte
RFID Chip Karte	1 Stück	B-CALE-RCC720	**Grüne** Plastikkarte

Table 4

REAGENZIEN & MATERIAL ZUSÄTZLICH ERHÄLTLICH

Stuhlextraktionsröhrchen

Extraktionsröhrchen werden zur Stuhlextraktion benötigt, aber nicht mitgeliefert. Eines der Devices **muss zusätzlich** zum Kit bestellt werden.

CALEX® Cap Extraktionsröhr-chen	50 oder 200 Röhrchen gefüllt mit 5 mL Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 Röhrchen bestehend aus Spatel und Böden	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, gefüllt mit 1.3 mL Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	B-CAL-SO50

Table 5

Kontrollen

Kontrollen für BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CALE25 können separat bestellt werden.

Kontrollen Niedrig*/Hoch*	2 Fläschchen, 0.5 mL	B-CALE-CONSET	Gebrauchsfertig

Table 6

* Lot spezifische Calprotectin Konzentration

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Sämtliche Kitkomponenten sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar.

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Keiner der Kitbestandteile enthält Material menschlicher Herkunft.
- Alle Patientenproben sollten gemäß Gute Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäß der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

Kit Komponenten

- Sämtliche Reagenzien und Proben müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18-28°C) äquilibriert werden.
  Die Reagenzien gut mischen (Vortex) vor dem Gebrauch.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit lots.
- Die Testkassetten dürfen nicht wiederverwendet werden.

Testablauf

- Lesen Sie die Testanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Leistungsdaten können negativ beeinflusst werden, wenn Reagenzien nicht korrekt verdünnt, behandelt oder unter Bedingungen gelagert werden, die von denen in der Arbeitsanleitung beschriebenen abweichen.
- Vor Testbeginn muss der Quantum Blue® Reader eingeschaltet werden. Calprotectin assay: B-CALE-RCC bzw. B-CALE-RCC720 muss programmiert sein (siehe Quantum Blue® Reader Handbuch).
- Benutzen Sie die weisse RFID Chipkarte, um die testspezifischen Parameter zu ändern.
- Unsachgemäße Handhabung der Patientenproben können zu unbrauchbaren Resultaten führen.
- Um verlässliche, quantitative Resultate zu erhalten, ist es wichtig, dass die im Extraktionsröhrchen befindliche Stuhl-probe vollständig homogenisiert wird.
- Verdünnte Extrakte sollten innerhalb einiger Stunden abgearbeitet werden und können nicht über einen längeren Zeitraum gelagert werden.
- Es ist wichtig, dass die Extrakte im Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ vor der Lagerung 5 Min bei 3.000xg zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand in ein frisches Röhrchen transferiert werden. Mit CALEX® Cap Device können die Extrakte direkt im Device gelagert werden. Zur Wiederverwendung / wieder Messung der Extrakte siehe Schritt 2 unter dem Kapitel Arbeitsanleitung.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex Mischer für die Stuhlextraktion.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen: 10-200 µl und 1 ml
- Zentrifuge
- 5 ml Polypropylen oder Polystyrol Einwegröhrchen zur Durchführung von Extraktverdünnung
- Laborwecker (optional)
- Quantum Blue® Reader bei BÜHLMANN erhältlich (Art.-Nr.: BI-POCTR-ABS)
- Papiertücher und Fließpapier

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Für die Stuhlextraktion mit einem Extraktionsbesteck wird weniger als 1 g native Probe benötigt (Table 5).

Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden und kann mindestens 6 Tage bei 2-8 °C gelagert werden.

Die Extrakte sind für mindestens 7 Tage bei 2-8 °C und mindestens 24 Monate bei -20°C stabil.

Wichtig: Die Stuhlproben dürfen nicht mit chemischen oder biologischen Zusätzen versetzt werden.

ARBEITSANLEITUNG

Der Arbeitsablauf gliedert sich in 3 Schritte:

1. **Extraktion der Stuhlproben:**
   Die Extraktion ist in der Arbeitsanleitung des gewählten Extraktionsröhrchen beschrieben.
2. **Verarbeitung des Extraktes:**

- Smart Prep oder ScheBo® Quick Prep™: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen. Die Stuhlextrakte mit Extraktionspuffer 1:10 verdünnen (z.B. 50 µL Extrakt + 450 µL Extraktionspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch für mindestens 5 Minuten bei 18-28°C stehen lassen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (3).
- CALEX® Cap Device: Die Extrakte nach der Extraktion 10 Minuten sedimentieren lassen, mit dem weissen Verschluss nach unten. Der Überstand kann dann ohne weitere Verdünnung in dem Lateral Flow Testablauf verwendet werden.

3. **Lateral Flow Testablauf und Quantifizierung**

   Es können zwei alternative Methoden von der jeweiligen RFID-Chipkarte geladen werden. B-CALE-RCC oder B-CALE-RCC720. Wählen Sie eine der RFID-Chipkarten vor dem Start der Experimente. Laden Sie die testspezifischen Parameter von der RFID Chipkarte.

3.1 Methode <B-CALE-RCC720> mit internem Zeitmesser

- Verwenden Sie die grüne Chipkarte.
- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden.
- 60 µl verdünnten Extrakt auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen.
- Den Kassettenhalter schliessen und den Start (<ENTER>) Knopf drücken.
- Der Lesevorgang startet automatisch nach 12 Minuten (720 Sek.).

3.2 Methode <B-CALE-RCC> ohne internen Zeitmesser

- Verwenden Sie die weisse Chipkarte.
- 60 µl verdünnten Extrakt auf die Ladevorrichtung der Kassette aufbringen.
- Die Kassette für 12 +/- 1 Minute inkubieren (einen Wecker manuell einstellen).
- Kassette auf den Kassettenhalter des Readers laden und auslesen durch Drücken auf den Start (<ENTER>) Knopf.

Hinweis: Nehmen Sie das Reader Manual zu Hilfe, wenn Sie mehr über die Basisfunktionen (Inbetriebnahme und Bedienung) erfahren wollen, insbesondere wie Testmethoden ausgewählt werden und wie lotspezifische Parameter von der RFID Chipkarte geladen werden, um die Proben messen zu können.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipetten, Temperatur und Zeitmesser, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubationsbedingungen.
- Der Selbsttest, der beim Einschalten des Quantum Blue® Readers durchgeführt wird, muss gültig sein.

VALIDIERUNG DER RESULTATE

- Damit das Testresultat als gültig bewertet wird, muss die Kontrollbande (C) klar ersichtlich sein (siehe Figuren 1A und 1B). Diese wird nur als Funktionskontrolle verwendet und kann nicht zur Interpretation der Testbande (T) benutzt werden. Falls die Testbande (T) nach 12 Minuten Inkubation nicht nachweisbar ist (Figur 1A), bedeutet dies, dass Calprotectin nicht nachweisbar ist. Falls die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar ist, wird die Calprotectin Konzentration in der Stuhlprobe durch den Quantum Blue® Reader berechnet.
- Falls nach der Inkubation nur die Testbande (T) sichtbar ist (Figur 1C), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Falls weder die Kontrollbande (C) noch die Testbande (T) nach der Inkubation nachweisbar sind (Figur 1D), ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.
- Da der Quantum Blue® Reader eine quantitative Bestimmung der Test (T) und der Kontrollbande (C) erlaubt, wird eine zusätzliche Validitätsprüfung durchgeführt. Falls die Signalintensität der Kontrollbande (C) nach der Inkubation einen bestimmten Wert unterschreitet, ist das Resultat ungültig und der Test muss mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG UND INTERPRETATION DER RESULTATE

- Der Lateral Flow Test wurde mit Hilfe des BÜHLMANN fCAL™ ELISA kalibriert (Art.-Nr.: EK-CAL).
- Der BÜHLMANN Quantum Blue® Reader verwendet für die Berechnung der Calprotectin Konzentration eine Lot-abhängige Standardkurve. Der messbare Bereich liegt zwischen 30 und 1000 µg/g.
- Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, können Proben über 1000 µg/g mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Assay High Range (order Code: LF-CHR25) erneut gemessen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind zur Bestimmung von humanem Calprotectin in extrahierten Stuhlproben optimiert.
- Fecale Calprotectin Werte sollten als zusätzliches Hilfsmittel genutzt werden, um die Diagnosestellung des Arztes zu erleichtern.
- Ein Wert, der mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin rapid Assay ermittelt wurde, kann mit der Messung anderer Biomarkers (wie des C-reaktiven Protein) oder durch Wiederholung der Calprotectinmessung bestätigt werden (mit dem BÜHLMANN fCAL™ ELISA oder unter Verwendung einer zweiten Testkassette). Die Ergebnisse können mit dem CDAI Score und der Klinik des Patienten verglichen werden, bevor eine klinische oder therapeutische Entscheidung getroffen wird.
- Während des Therapie-Follow-ups sollte jedes, mit dem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended Schnelltest erzielte Testergebnis, im Vergleich zu den Vorergebnissen und dem klinischen Bild des Patientenbefunden werden.

ERWARTETE WERTE

Die Bestimmung von Calprotectin aus Stuhlproben ist eine verlässliche und einfache Methode, um organische von funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen zu unterscheiden.
Die folgenden Daten wurden mit dem BÜHLMANN fCAL™ ELISA erhoben. In einer klinischen Studie wurde von 401 Patienten, bei denen eine endoskopische Untersuchung durchgeführt wurde, Calprotectin im Stuhl (Table 18). Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 273 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 128 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Morbus Crohn, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektions-erkrankungen).
Die ROC Analyse (AUC: 0.935) ergab einen klinischen Grenzwert von 50 µg/g Calprotectin. Wendet man diesen Grenzwert bei der Unterscheidung zwischen organischen und funktionellen Erkrankungen an, kann eine klinische Spezifität von 84.4% und eine Sensitivität von 94.5% erreicht werden.
Calprotectin Werte von Erwachsenen und Kindern zwischen 4 und 17 Jahren sind vergleichbar (Ref. 7), während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (Ref. 6).
Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Normalwerte unter 50 µg/g:
Calprotectin Werte <100 µg/g deuten nicht auf eine entzündliche Erkrankung des Darmes hin. Weitere Untersuchungen durch einen Spezialisten oder eine medikamentöse Behandlung werden empfohlen (Ref. 4).

Erhöhte Werte zwischen 50 und 200 µg/g:
Calprotectin Werte zwischen 50 und 200 µg/g können durch eine milde Form der organischen Erkrankung wie z.B. eine durch NSAIDs verursachte Entzündung, eine milde Form der Divertikulitis und durch IBD in einer Remissionsphase verursacht werden. Da eine geringe Entzündungsaktivität vorhanden ist, empfehlen sich eine Wiederholungsmessung und weitere Untersuchungen.

Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:
Calprotectin Werte >200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung des gastrointestinalen Traktes hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch einen Gastro-enterologen und therapeutische Massnahmen werden empfohlen.

LEISTUNGSMERKMALE

Limit of Blank (LoB): <20 µg/g Calprotectin.

Limit of Detection (LoD): <30 µg/g Calprotectin.

Limit of Quantification (LoQ):
Unterer LoQ: ≤30 µg/g Calprotectin
Oberer LoQ: ≥1000 µg/g Calprotectin
Die LoD wurde ermittelt mit Hilfe von 14 Stuhlextrakten. Das entsprechende Präzisionsprofil ist in Figure 2 dargestellt. Die Nachweisgrenze entspricht derjenigen Calprotectin-konzentration, die eine Streuung von <25% CV zeigt und damit eine quantitative Bestimmung innerhalb eines Bereiches von 30 (unterer LoQ) bis 1000 µg/g (oberer LoQ) ermöglicht.

Linearität: Die Ergebnisse zeigen eine Linearität der Ergebnisse innerhalb des angegebenen Messbereiches von 30 bis 1000 µg/g für alle Quantum Blue® Calprotectin Extended Test Proben.

Wiederfindung: Die Wiederfindung variierte zwischen 90.6% - 101.8%.

Repeatability: 20.1% CV. Die Repeatability des Quantum Blue® Calprotectin Extended Tests wurde berechnet mit Hilfe von 8 Stuhlextrakten. Die Mittelwerte von 3 verschiedenen Lots von Testkassetten werden in (Table 19) dargestellt. Die Repeatability liegt zwischen 17.9% - 23.9% CV.

Inter-lot Präzision: 20.8% CV. Die Inter-Lot Präzision der Quantum Blue® Calprotectin Extended Tests wurde berechnet mit Hilfe von 8 Stuhlextrakten mit Calprotectingehalten zwischen 30 und 1000 µg/g. Die errechneten CVs lagen zwischen 16.1% und 24.1%.

Methodenvergleich: R^2 = 0.94; y=1.05-3.91 µg/g
50 Stuhlextrakte von Patienten, mit Messwerte innerhalb des angegebenen Quantum Blue® Calprotectin Extended Test Messbereiches zeigten, wurden gemäß der Anleitung angesetzt, gemessen und verglichen mit den Ergebnissen, die im BÜHLMANN fCAL™ ELISA (Bestellcode: EK-CAL) gewonnen wurden. Die Korrelation wird in Figure 3 dargestellt.

FRANÇAIS

UTILISATION PREVUE

Le test immunologique BÜHLMANN, Quantum Blue® Calprotectin Extended, est conçu pour la détermination quantitative de concentrations de calprotectine dans des échantillons de selles (ref.1-6) en association avec le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.
Uniquement pour utilisation professionnelle*.
*Canada, Taiwan : Utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

Le test permet la mesure sélective de l'antigène de la calprotectine par un dosage immunologique de type sandwich. Un anticorps monoclonal de capture (mAb) hautement spécifique de la calprotectine est déposé sur la membrane test. Un second anticorps monoclonal, conjugué à de l'or colloïdal permettant la détection, est présent sur la bande de libération du conjugué. Il est libéré dans le système après ajout de l'échantillon de selle extrait et dilué. Le conjugué calprotectine/anti-calprotectine-or se lie à l'anticorps anti-calprotectine déposé sur la membrane test (ligne test) et le restant du conjugué or anti-calprotectine qui n'a pas réagi se lie à l'anticorps de chèvre anti-souris déposé sur la membrane test (ligne contrôle). Les intensités de signal de la ligne de test et de la ligne de contrôle sont mesurées quantitativement par le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Commentaires
Cassette test	25 pièces	B-LFCALUS-TC	Scellée sous vide dans un sachet
Tampon d'extraction	1 flacon 125 ml	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CALE-RCC	Carte en plastique **blanche**
Carte à puce RFID	1 pièce	B-CALE-RCC720	Carte en plastique **verte**

Table 7

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS SELON LA DEMANDE

Dispositifs d'extraction de selles

Les tubes d'extraction de selles décrits ci-après ne sont pas inclus dans le kit. Ils peuvent **être commandés** en même temps que le kit.

CALEX® Cap	50 ou 200 dispositifs pré-remplis avec 5 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubes, comprenant chacun spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes comprenant chacun cône & embout du doseur, pré-remplis avec 1.3 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CAL-SO50

Table 8

Contrôles

Les contrôles pour le test BÜHLMANN Quantum Blue® LF-CALE25 peuvent être commandés séparément.

Contrôles Bas*/Elevé*	2 flacons, 0.5 ml	B-CALE-CONSET	Prêts à l'emploi

Table 9

*Concentration en calprotectine spécifique pour chaque lot

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION DES REACTIFS

Tous les composants du kit sont stables à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.

PRÉCAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Aucun des réactifs de ce test ne contient de composants d'origine humaine.
- Les échantillons des patients doivent être manipulés en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et avec les précautions requises, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des infections.
- Toute solution non utilisée doit être éliminée conformément aux réglementations locales et nationales en vigueur.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

Composants du kit

- Tous les réactifs et échantillons à tester doivent être équilibrés à température ambiante (18-28°C) avant de démarrer le dosage.
  Bien mélanger (vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les constituants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Les cassettes test sont à usage unique.

Procédure de test

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Les performances du test peuvent se dégrader en cas de dilution incorrecte des réactifs, ou bien si ces derniers sont manipulés ou stockés dans des conditions autres que celles spécifiées.
- Le Quantum Blue® Reader doit être allumé et programmé pour le dosage de la calprotectine: B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720, avant de commencer le test (voir le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader).
- Utiliser la carte à puce RFID blanche pour modifier les paramètres du test spécifiques pour chaque lot.
- Une manipulation incorrecte des échantillons à tester peut entraîner de faux résultats.
- Afin d'obtenir des résultats fiables et quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'échantillon de selle en totalité dans le dispositif d'extraction.
- Les échantillons dilués doivent être utilisés dans un délai de quelques heures et ne peuvent être conservés plus longtemps.
- Il est important de centrifuger les extraits avec Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ avant de les conserver, 5 min à 3000 x g. Après centrifugation, le surnageant doit être transféré dans un nouveau tube frais de conservation. Avec les tubes CALEX® Cap, les extraits peuvent être stockés directement dans le dispositif d'extraction. Pour la réutilisation / réévaluation des extraits voir l'étape 2 dans le chapitre Procédure de dosage.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Vortex pour l'extraction des selles
- Pipettes de précision à extrémités jetables : 10, 200 µl et 1 ml
- Centrifugeuse
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène de 5 ml
- minuteur (facultatif)
- Quantum Blue® Reader disponible chez BÜHLMANN (code de commande : BI-POCTR-ABS)
- Papier absorbant

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure nécessite moins de 1 g de selle native par extraction en utilisant un dispositif d'extraction (Table 8).

Le prélèvement de selles se fait dans des tubes ordinaires. Elles se conservent au réfrigérateur à 2-8°C au moins 6 jours.

Les extraits sont stables pendant au moins 7 jours à 2-8°C et au moins 24 mois à -20ºC.

Important : Les échantillons doivent être prélevés sans additifs.

PROCEDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage se déroule en 3 étapes :

1. **Extraction des échantillons de selles** :
   La procédure d'extraction est décrite dans le manuel d'utilisation fourni avec les tubes d'extraction respectifs.
2. **Préparation des extraits** :

- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™ : après extraction, laisser les extraits sédimenter pendant 10 minutes. Diluer l'extrait au 1/10ème avec du tampon d'extraction (par exemple : 50 µL d'extrait et 450 µL de tampon d'extraction) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons reposer pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28°C) avant de procéder à la prochaine étape (étape 3).
- Tube d'extraction CALEX® Cap : après extraction, laisser sédimenter les extraits pendant 10 minutes, embout blanc vers le bas. Dévissez le bouchon bleu. Le surnageant peut être utilisé sans autre dilution dans l'essai en flux latéral.

3. **Dosage en flux latéral et lecture du résultat**

   Deux méthodes alternatives peuvent être chargées de la carte à puce RFID respective < B-CALE-RCC720 > et < B-CALE-RCC >. Sélectionnez l'une des cartes à puce RFID avant de procéder au test.

   Charger les paramètres spécifiques au lot de réactif au moyen de la carte à puce RFID.

3.1. Méthode < B-CALE-RCC720 > avec minuteur interne

- Utilisez la carte en plastique verte.
- Déposer la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Ajouter 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Fermer le tiroir et lancer l'analyse en appuyant sur le bouton de démarrage.
- La lecture démarre automatiquement après un délai de 12 minutes (720 s).

3.2. Méthode < B-CALE-RCC > sans minuteur interne

- Utilisez la carte en plastique blanche.
- Déposer 60 µL d'extrait dilué via l'orifice de chargement de la cassette test.
- Laisser incuber pendant 12 +/- 1 minutes en utilisant un minuteur externe.
- Charger la cassette test dans le tiroir du lecteur.
- Lancer immédiatement la lecture de la cassette en appuyant sur le bouton de démarrage du lecteur Quantum Blue®.

Remarque : consulter le mode d'emploi du Quantum Blue® Reader pour plus de détails concernant les fonctions de base, l'initialisation et l'utilisation du lecteur, en particulier comment choisir la méthode de test et charger les paramètres de lot de la carte à puce RFID en vue de mesurer des échantillons.

CONTROLE DE QUALITE

- Si la précision du dosage n'est pas corrélée avec les limites établies et que la répétition exclut toute erreur technique, on vérifiera les paramètres suivants : i) pipetage, dispositifs de contrôle de la température et du temps, ii) date d'expiration des réactifs et iii) conditions de conservation et d'incubation.
- L'auto-vérification effectuée lors de la mise en marche du lecteur Quantum Blue® doit être valide.

VALIDATION DES RESULTATS

- Pour valider un résultat de test, la ligne de contrôle (C) doit toujours être visible (voir Figures 1A et 1B). Cette ligne est uniquement utilisée comme contrôle fonctionnel du test et ne peut servir à l'interprétation de la ligne de test (T). Si la ligne de test (T) n'est pas détectable au bout de 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1A), cela signifie qu'aucune quantité détectable de calprotectine n'est présente dans l'échantillon de selle. Si une ligne de test (T) est détectable au bout de 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1B), la quantité de calprotectine présente dans l'échantillon de selle est calculée par le Quantum Blue® Reader.
- Si seule la ligne de test (T) est détectable après 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1C), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une cassette test.
- Dans le cas où ni la ligne de contrôle (C) ni la ligne de test (T) ne sont détectables au bout de 12 minutes de temps d'incubation (Figure 1D), le résultat du test n'est pas valable et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.
- Étant donné que le Quantum Blue® Reader permet une évaluation quantitative des lignes de test (T) et de contrôle (C), une vérification supplémentaire de la validité de la ligne de contrôle (C) est effectuée. Si l'intensité du signal de la ligne de contrôle (C) est en dessous d'un seuil au bout de 12 minutes de temps d'incubation, le résultat du test est également non valide et le dosage de la calprotectine doit être répété en utilisant une nouvelle cassette test.

STANDARDISATION

- Le dosage en flux latéral est calibré avec le test BÜHLMANN fCAL™ ELISA (code de commande : EK-CAL).
- Le BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilise une courbe standard spécifique du lot pour calculer la concentration de calprotectine. La gamme de mesure se situe entre 30 et 1000 µg/g.
- Pour les mesures quantitatives, les échantillons inconnus qui ont des valeurs au-dessus à 1000 µg/g peuvent être testés à nouveau avec le test de dosage BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range (code de commande : LF-CHR25).

LIMITES

- Les réactifs fournis dans ce coffret sont optimisés pour le dosage de calprotectine dans les échantillons de selles.
- Les valeurs de calprotectine fécale pourraient être considérées comme des indications supplémentaires et permettre au médecin de poser un diagnostic.
- Le résultat d'un dosage de calprotectine obtenu avec le dosage BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin peut être confirmé en dosant d'autres marqueurs biologiques, comme la protéine C réactive, en répétant le dosage de la calprotectine par BÜHLMANN fCAL™ ELISA (référence : EK-CAL) ou en utilisant une seconde cassette test. Comparer l'indice CDAI du patient à son état clinique avant de prendre quelque décision clinique et/ou thérapeutique que ce soit.

- Pendant le suivi thérapeutique, interpréter le résultat d'un dosage rapide de la calprotectine à l'aide du BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended en le comparant aux précédents, dans le contexte du tableau clinique du patient.

INTERPRETATION DES RESULTATS

L'estimation du taux de calprotectine fécale est une façon facile et fiable de différencier les maladies organiques des maladies fonctionnelles du tractus gastro-intestinal.
Les données suivantes ont été établies avec le test BÜHLMANN fCAL™ ELISA (code de commande : EK-CAL). Dans une étude clinique, 401 patients symptomatiques devant subir une coloscopie ont été étudiés (Table 18). L'examen endoscopique a montré que 273 patients présentaient des maladies fonctionnelles tandis que 128 patients avaient différentes maladies organiques (colite, maladie de Crohn, ulcère, diverticulite, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses).
L'analyse des courbes ROC (ASC : 0,935) a permis d'établir une valeur seuil clinique optimale de 50 µg/g. Pour différencier une maladie organique d'une maladie fonctionnelle, l'application de ce seuil permet d'atteindre une sensibilité et une spécificité cliniques de 84,4% et de 94,5%, respectivement. Le niveau suggéré de la valeur seuil pour les adultes (<50 µg/g) peut être utilisé pour les enfants âgés de 4 à 17 ans des deux sexes (réf. 7). Tandis que les taux fécaux de calprotectine des enfants et des adultes sont comparables, les taux relevés chez le nouveau-né peuvent être significativement augmentés (réf. 6).

Valeurs inférieures à 50 µg/g :
Les valeurs de calprotectine <50 µg/g ne sont pas indicatives d'une inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal. Les échantillons de patients ayant un niveau bas de calprotectine fécale ne nécessitent donc plus aucune procédure invasive pour déterminer la cause de l'inflammation (réf. 4).

Valeurs élevées entre 50 et 200 µg/g :
Les valeurs de calprotectine obtenues entre 50 et 200 µg/g peuvent représenter une maladie organique telle qu'une inflammation causée par les AINS, une diverticulite non sévère ou un syndrôme de l'intestin irritable en phase de rémission. La faible réponse inflammatoire observée dans cette gamme de concentration suggère de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Valeurs élevées supérieures à 200µg/g :
Les valeurs de calprotectine >200 µg/g indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est suggéré de réaliser des examens complémentaires et de mettre en place un traitement curatif sous le suivi de médecins spécialistes.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de blanc (LoB) : < 20 µg/g de calprotectine.

Limite de détection (LoD) : <30 µg/g de calprotectine.

Limite de quantification (LoQ) :
LoQ inférieure : ≤ 30 µg/g de calprotectine
LoQ supérieure : ≥ 1000 µg/g de calprotectine
La LoQ est obtenue à partir de 14 extraits de selles. Le profil de précision résultant est illustré sur la Figure 2. La limite de quantification correspond à la concentration de calprotectine avec une imprécision inférieure à 25 % de CV. Il est donc possible d'obtenir une mesure quantitative entre 30 (LOQ inférieure) et 1000 µg/g (LOQ supérieure).

Linéarité : Les résultats démontrent une linéarité dans l'intervalle de mesure conseillé, 30 à 1000 µg/g, du système de dosage Quantum Blue® Calprotectin Extended pour l'ensemble des échantillons.

Récupération : La récupération varie de 90.6 % - 101.8 %.

Répétabilité : 20.1 % de CV. La répétabilité du dosage Quantum Blue® Calprotectin Extended est calculée à partir de huit échantillons d'extraits de selles. Les valeurs moyennes pour trois lots différents de cassettes test sont répertoriées dans la Table 19. La répétabilité des échantillons varie de 17.9 % à 23.9 % de CV.

Précision inter-lots : 20.8%. La précision inter-lots du système de dosage Quantum Blue® Calprotectin Extended a été calculée à partir de huit échantillons d'extraits de selles dont les valeurs de la calprotectine sont comprises entre 30 et 1000 µg/g. Les valeurs inter-lots des échantillons varient de 16.1 % à 24.1 % de CV.

Comparaison des méthodes : R^2 = 0.94 ; y=1.05-3.91 µg/g. 50 extraits de selles et présentant des concentrations en calprotectine dans l'intervalle de mesure conseillé du système de dosage Quantum Blue® Calprotectin Extended sont analysés selon le mode opératoire de dosage. Les résultats sont ensuite comparés aux valeurs obtenues avec le dosage ELISA BÜHLMANN fCAL™ (référence : EK-CAL). Les résultats de corrélation sont illustrés sur la Figure 3.

ITALIANO

USO PREVISTO

Il test BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended è un immunodosaggio per la determinazione quantitativa di valori di calprotectina in campioni di feci umane (ref. 1-6) in associazione con lo strumento per la lettura BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.
Solo per uso professionale*.
*Canada, Taiwan: Solo per uso nel laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test consente la determinazione quantitativa dell'antigene Calprotectina mediante un immunodosaggio a sandwich. Un anticorpo monoclonale di cattura (mAb) molto specifico per la calprotectina riveste la membrana di rilevazione. Un secondo anticorpo monoclonale di rilevazione, coniugato a oro colloidale e deposto sul supporto di rilascio del coniugato, viene rilasciato nel sistema di reazione in seguito all'aggiunta dell'estratto diluito del campione di feci. Il complesso calprotectina/anti-calprotectina coniugato con oro si lega all'anticorpo anti-calprotectina legato alla membrana (linea di rilevazione; banda di rilevazione) e l'anti-calprotectina coniugato con oro in eccesso si lega all'anticorpo di capra anti-topo legato alla membrana (linea di controllo; banda di controllo). Le intensità di segnale della banda di rilevazione e della banda di controllo vengono misurate quantitativamente con il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Commenti
Card di rilevazione	25 unità	B-LFCALUS-TC	Sigillata a vuoto in busta laminata
Tampone di estrazione	1 flacone 125 ml	B-CAL-EX	Pronto per l'uso
Carta chip RFID	1 unità	B-CALE-RCC	Carta RFID **bianca**
Carta chip RFID	1 unità	B-CALE-RCC720	Carta RFID **verde**

Table 10

REAGENTI E MATERIALI FORNITI SU RICHIESTA

Dispositivi di estrazione delle feci

I dispositivi di estrazione delle feci descritte di seguito non sono forniti nel kit e **occorre ordinare** l'uno o l'altro insieme al kit.

Dispositivo CALEX® Cap	50 o 200 dispositivi contenenti 5 mL di tampone di estrazione, pronto all'uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 dispositivi, costituiti da spatole e camere di raccolta feci	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 dispositivi costituiti da provetta, cono & tappo dosatore, contenenti 1.3 mL di tampone di estrazione / pronto all' uso	B-CAL-SO50

Table 11

Controlli

Il set di controlli per il Kit Quantum Blue® LF-CALE25 possono essere ordinati separatamente.

Controlli (alto/basso)*	2 flaconi, 0.5 ml	B-CALE-CONSET	Pronto all'uso

Table 12

*concentrazioni di Calprotectina lotto specifiche

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Tutti i componenti del kit sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette.

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Nessuno dei reagenti di questo test contiene componenti di origine umana.
- I campioni dei pazienti vanno gestiti adottando le precauzioni appropriate come se fossero potenzialmente infetti e in conformità alle Buone prassi di laboratorio (BPL).
- La soluzione inutilizzata va smaltita nel rispetto delle disposizioni locali, regionali e nazionali in materia.

PRECAUZIONI TECHNICHE

Componenti del kit

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (18-28°C) prima di iniziare l'analisi. Miscelare bene (con vortex) i reagenti primi dell'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Le card di rilevazione non vanno riutilizzate.

Procedura del test

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, gestiti o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Il Quantum Blue® Reader deve essere acceso e programmato per il dosaggio della Calprotectin: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720, prima di iniziare l'analisi (vedere il manuale del Quantum Blue® Reader)
- Utilizzare la carta RFID bianca per modificare i parametri del test specifici per ogni lotto.
- I campioni manipolati in modo scorretto possono dare origine a risultati inesatti.
- Per ottenere risultati affidabili e quantitativi, è importante che i campioni di feci vengano completamente omogeneizzati con il sistema di estrazione
- I campioni diluiti devono essere utilizzati entro alcune ore e non possono essere conservati più a lungo.
- È importante che gli estratti con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ siano centrifugati 5 min. a 3.000 x g prima della conservazione. Dopo la centrifugazione, il surnatante deve essere trasferito in una nuova provetta. Con il dispositivo CALEX® Cap è possibile conservare gli estratti direttamente con il dispositivo. Per il riutilizzo / rimisurazione degli estratti vedere il passo 2 sotto il capitolo Procedura del Test.

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Miscelatore vortex per l'estrazione delle feci
- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-200 µl e 1 ml
- Centrifuga
- Provette in polipropilene o polistirene di 5 ml per la diluizione degli estratti
- Timer (facoltativo)
- Quantum Blue® Reader fornito da BÜHLMANN (codice: BI-POCTR-ABS)
- Salviette o carta da blotting

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Se si utilizzano i dispositivi di estrazione suggeriti (vedere tabelle 11) la procedura richiede meno di 1 g di feci native per l'estrazione.
Prelevare il campione di feci in provette o contenitori. I campioni possono conservati a 2-8°C per 6 giorni.
Gli estratti sono stabili a 2-8°C per almeno 7 giorni e a ≤-20°C per almeno 24 mesi.
Importante: il campione deve essere prelevato senza l'aggiunta di additivi chimici o biologici nel dispositivo di raccolta.

PROCEDURA DEL TEST

La procedura si compone di tre fasi distinte:

1. **Estrazione dei campioni di feci:**
   L'estrazione è descritta nelle istruzioni per l'uso fornite con i rispettivi sistemi di estrazione.
2. **Trattamento del campione:**

- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti. Diluire il surnatante 1:10 con il tampone di estrazione (es. 50 µL di estratto e il 450 µL di tampone di estrazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28 °C prima di procedere alla prossima fase (fase no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap: Dopo l'estrazione, fare decantare l'estratto del campione di feci per almeno 10 minuti con l'estremità col tappo bianco rivolta verso il basso. Svitare il cappuccio blu. Il supernatante può essere utilizzato senza ulteriore diluizione nel test a flusso laterale.

3. **Dosaggio a flusso laterale e lettura:**
   Due metodi alternativi possono essere caricati dalla rispettiva carta chip RFID. B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720. Selezionare una delle carte chip RFID prima di iniziare gli esperimenti. Caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID.

3.1 Metodo < B-CALE-RCC720> con timer interno

- Utilizzare la carta di plastica verde.
- Caricare la card sul supporto per cassetta test del Reader.
- Aggiungere 60 µl di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella card.
- Chiudere il supporto per cassetta e iniziare la misurazione premendo il pulsante di avvio.
- La scansione inizia automaticamente dopo 12 minuti (720 secondi).

3.2 Metodo < B-CALE-RCC > senza timer interno

- Utilizzare la carta di plastica bianca.
- Aggiungere 60 µl di estratto di feci diluito sulla porta di carico del campione nella card.
- Incubare per 12 minuti +/- 1 minuto (impostare un timer manuale).
- Caricare la card sul supporto per cassetta test del Reader.
- Scansionare la cassetta con il Quantum Blue® Reader premendo il pulsante (<ENTER>) immediatamente.

Importante: Consultare il manuale del Quantum Blue® Reader per informazioni sulle funzioni di base e su come avviare e mettere in funzione il Reader, in particolare per informazioni sulla selezione dei metodi di analisi e su come caricare i parametri specifici del lotto dalla carta chip RFID in modo da poter quantificare i campioni.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori tecnici, si controllino gli aspetti seguenti: i) dispositivi di pipettaggio, controllo della temperatura e timer, ii) data di scadenza dei reagenti e iii) condizioni di conservazione e incubazione.
- Il self-test, che viene eseguito quando si accende il Quantum Blue® Reader, deve essere valido.

VALIDAZIONE DEI RISULTATI

- Per un risultato valido, la banda di controllo (C) deve in ogni caso essere visibile (vedere Figure 1A e 1B). Tale banda rappresenta unicamente un controllo funzionale del test e non può essere utilizzata per interpretare la banda di rilevazione (T). Se la banda di rilevazione (T) non è rilevabile dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1A), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci è al di sotto del limite di rilevazione. Se la banda di rilevazione (T) è rilevabile dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1B), la concentrazione di calprotectina presente nel campione di feci viene misurata tramite il Quantum Blue® Reader.
- Se è rilevabile solo la banda di rilevazione (T) dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1C), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- Se né la banda di controllo (C), né la banda di rilevazione (T) sono rilevabili dopo 12 minuti di incubazione (Figura 1D), il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.
- Dal momento che il Quantum Blue® Reader effettua una valutazione quantitativa sia delle bande di rilevazione (T) che di controllo (C), una ulteriore verifica della banda di controllo (C) è necessaria. Se l'intensità di segnale della banda di controllo (C) è inferiore alla soglia specifica dopo 12 minuti di incubazione, il risultato non è valido e il dosaggio della calprotectina deve essere ripetuto con una nuova card.

STANDARDIZZAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Il dosaggio a flusso laterale è stato calibrato utilizzando come riferimento il saggio BÜHLMANN fCAL™ ELISA (codice: EK-CAL).
- Il BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utilizza una curva standard lotto-specifica per calcolare la concentrazione di Calprotectina. L'intervallo del dosaggio è compreso tra 30 e 1000 µg/g.
- Per le determinazioni quantitative, i campioni non noti con concentrazioni superiore a 1000 µg/g possono essere rianalizzati con il saggio BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range (codice: LF-CHR25).

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti in questo kit sono ottimizzati per dosare la Calprotectina umana da campioni di feci dopo procedura di estrazione.
- I valori di calprotectina dovrebbero essere utilizzati come ausilio supplementare a disposizione del medico per effettuare una diagnosi.
- Prima di prendere qualsiasi decisione clinica e/o terapeutica, il risultato del test della calprotectina ottenuto con il dosaggio rapido BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin può essere confermato misurando altri biomarcatori (come ad esempio la proteina reattiva

C) o ripetendo il test della calprotectina BÜHLMANN fCAL™ ELISA (codice: EK-CAL, o utilizzando una seconda card) e confrontando i risultati con il punteggio CDAI e lo stato clinico del paziente.
- Nel monitoraggio della terapia, un risultato del test ottenuto con il dosaggio rapido BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended può essere interpretato mediante confronto del risultato con i risultati precedenti, e nel contesto del quadro clinico del paziente.

VALORI ATTESI

La determinazione della calprotectina fecale è un metodo affidabile e semplice per distinguere tra patologie gastrointestinali organiche e funzionali.
I dati seguenti sono stati ottenuti con il BÜHLMANN fCAL™ ELISA (codice: EK-CAL). In uno studio clinico sono stati valutati 401 pazienti sintomatici consecutivi in attesa di colonscopia (Table 18). All'esame endoscopico, 273 pazienti sono risultati affetti da patologie funzionali, mentre 128 pazienti presentavano svariate patologie organiche (colite, morbo di Crohn, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, neoplasie maligne o malattie infettive).
L'analisi della curva ROC (AUC: 0,935) ha evidenziato un valore soglia clinico ottimale a 50 µg/g. Applicando tale valore soglia, nella differenziazione tra patologie organiche e funzionali si ottengono valori di sensibilità e specificità clinica dell' 84,4% e del 94,5%, rispettivamente. I valori soglia indicati per gli adulti (<50 µg/g) possono essere utilizzati anche per i bambini di età compresa tra 4 e 17 anni, indipendentemente dal sesso (ref. 7). Mentre negli adulti e nei bambini i livelli di calprotectina fecale sono paragonabili, i livelli riscontrati nei neonati possono essere aumentati in misura significativa (ref. 6).
Interpretazione dei risultati:

Valori <50 µg/g:
I valori di Calprotectina <50 µg/g non sono indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale. Per pazienti con bassi livelli di Calprotectina probabilmente non sono necessarie ulteriori procedure invasive per determinare le cause dell'infiammazione (ref. 4).

Valori tra 50 µg/g e 200 µg/g:
I valori di Calprotectina compresi tra i 50 e i 200 µg/g possono indicare malattia di lieve entità, una infiammazione causata da FANS, una debole diverticolite e una IBD in fase di remissione. La bassa risposta infiammatoria mostrata in questo range può suggerire di ripetere la misurazione e di eseguire ulteriori indagini.

Valori superiore 200 µg/g:
Valori di Calprotectina >200 µg/g sono indicativi di attiva malattia organica con infiammazione nel tratto gastrointestinale. Sono suggerite appropriate ulteriori. procedure investigative e curative eseguite da specialisti.

PERFORMANCE CHARATTERISTICA

Limite del Bianco (LoB): <20 µg/g di calprotectina.

Limite di rilevabilità (LoD): <30 µg/g di calprotectina

Limite di Quantificazione (LoQ):
LoQ inferiore ≤30 µg/g di calprotectina
LoQ superiore ≥1000 µg/g di calprotectina
Il LoQ è stato stabilito con 14 estratti fecali. Il profilo di precisione risultante è mostrato in Figure 2. Il limite di quantificazione corrisponde alla concentrazione di calprotectina con un'imprecisione inferiore al 25% di CV, che consente una misurazione quantitativa nel range da 30 (LoQ inferiore) a 1000 µg/g (LoQ superiore).

Linearità: I risultati mostrano una linearità all'interno dell'intervallo di misurazione indicato tra 30 e 1000 µg/g del saggio Quantum Blue® Calprotectin Extended per tutti i campioni.

Recupero: Il recupero del saggio dei campioni varia tra 90.6% e 101.8%.

Ripetibilità: 20.1% di CV. La ripetibilità del saggio Quantum Blue® Calprotectin Extended è stata calcolata da otto campioni di estratti fecali. I valori medi di tre diversi lotti di card sono presentati in Table 19. La ripetibilità del saggio dei campioni varia tra 17.9% e 23.9% CV.

Precisione inter-lotto: 20.8% di CV. La precisione inter-lotto del saggio Quantum Blue® Calprotectin Extended è stata calcolata da otto campioni di estratti di feci contenenti tra 30 e 1000 µg/g di calprotectina. I dati inter-lotto dei campioni variavano tra 16.1% e 24.1% CV.

Confronto dei metodi: R^2 = 0.94; y=1.05-3.91 µg/g 50 estratti fecali da pazienti con concentrazioni di calprotectina all'interno dell'intervallo di misurazione indicato del saggio Quantum Blue® Calprotectin Extended sono stati analizzati con la procedura prevista per il dosaggio; i risultati sono stati confrontati con i valori ottenuti mediante la procedura di dosaggio BÜHLMANN fCAL™ ELISA (codice: EK-CAL). Le correlazioni sono illustrate in Figura 3.

ESPAÑOL

INDICACIONES DE USO

El análisis Quantum Blue® Calprotectin Extended de BÜHLMANN es un inmunoensayo diseñado para la determinación cuantitativa de concentraciones de calprotectina en muestras de heces humanas (ref. 1-6) en combinación con el lector BÜHLMANN Quantum Blue®.
Sólo para uso profesionale*.
*Canada, Taiwan: Solo para uso en el laboratorio.

PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El análisis permite la determinación selectiva del antígeno calprotectina mediante inmunoanálisis tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal se encuentra en la zona de dispensación de la muestra y se libera en el sistema después de añadir la muestra de heces extraída y diluida. El complejo [calprotectina / anticalprotectina oro coloidal] se unirá al anticuerpo de captura monoclonal altamente específico para calprotectina situado en la línea test (banda test) y la [anticalprotectina oro coloidal libre] se unirá al anticuerpo que recubre la línea control (banda control). Las intensidades de la señal en la línea test y la línea control se miden cuantitativamente mediante el lector Quantum Blue® de BÜHLMANN.

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
Cartucho de prueba	25 unidades	B-LFCALUS-TC	Sellado al vacío en una bolsa de aluminio
Tampón de extracción	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CALE-RCC	Tarjeta de plástica **blanca**
Tarjeta chip RFID	1 unidad	B-CALE-RCC720	Tarjeta de plástica **verde**

Table 13

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Dispositivos de extracción fecal

Los dispositivos de extracción fecal que se describen a continuación no se incluyen en el kit y el que se elija **debe ser pedido** con el kit.

Dispositivos CALEX® Cap	50 o 200 dispositivos, contienen 5 mL tampón de extracción, listos para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubos, constituyendo di espátulas y fondos	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos de extracción constituyendo di tubo, cono & punta dosifiatora contienen 1.3 mL de tampón de extracción¸ listos para usar.	B-CAL-SO50

Table 14

Controles

El set de controles para ser utilizados facultativamente con el Kit Quantum Blue® LF-CAL25 puede ser pedido adicionalmente.

Controles (alto/bajo)*	2 viales, 0.5 mL	B-CALE-CONSET	Listo para usar

Table 15

*concentración de calprotectina especifico del lote.

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del equipo permanecen estables a una temperatura entre 2 y 8 ºC, hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Ninguno de los reactivos de esta prueba tiene componentes de origen humano.
- Las muestras de pacientes se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones, manipulándose conforme a buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones apropiadas.
- La solución no utilizada se debe desechar conforme a las normativas locales, estatales y federales.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

Componentes del kit

- Deje que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (18-28°C) y mézclelos bien (con agitador de vórtice) antes de ser utilizados.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Los casetes de prueba no deben ser reutilizados.

Procedimiento de análisis

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- El lector Quantum Blue® debe ponerse en funcionamiento y programarse para el análisis de Calprotectin: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720, antes de iniciar el análisis (véase el manual del lector Quantum Blue®).
- Utilizare la tarjeta blanca con chip RFID para modificare los parámetros de prueba específicos de lote.
- A fin de obtener unos resultados fiables y cuantitativos, es importante homogeneizar completamente la muestra de heces en el dispositivo de extracción. Una manipulación incorrecta de las muestras de pacientes puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- Las muestras diluidas deberán utilizarse en un plazo de varias horas y no pueden conservarse durante un tiempo más prolongado.
- Es importante centrifugar los extractos con Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™ antes de la conservación (5 minutos a 3.000 x g). Después de la centrifugación, el sobrenadante debe transferirse en un tubo de conservación nuevo. Con CALEX® Cap dispositivo puede almacenar los extractos directamente con el dispositivo. Para la reutilización / nueva medición de los extractos de ver el paso 2 en el capítulo Procedimiento del análisis.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Vórtex para la extracción de heces.
- Pipetas de precisión con puntas desechables: 10 a 200 µl y 1 ml.
- Centrífuga.
- Tubos de 5 ml desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones los extractos

- Cronómetro (optativo).
- Lector Quantum Blue® disponible de BÜHLMANN (código para pedidos: BI-POCTR-ABS).
- Pañuelos suaves o papel secante.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El procedimiento requiere menos de 1 g de heces nativas por extracción usando el dispositivo de extracción fecal(referirse a la Table 14).
Recoger la muestra de feces en tubos sencillos y conservarla refrigerada a 2-8°C hasta 6 días.
Los extractos son estables a 2-8 °C por lo menos 7 dias
y a ≤ -20°C por lo menos 24 meses.
Importante: La muestra debe recogerse sin ningún aditivo químico o biológico en el dispositivo de recogida.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

El procedimiento del análisis consiste en tres pasos:

1. **Extracción de las muestras de heces:**

   La extracción se describe en las instrucciones de uso entregadas con los respectivos dispositivos de extracción.

2. **Procesamiento de las muestras:**

- Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™: Diluir las extractos de heces 1:10 con tampon de extracción (e.g. 50 µL extracto y 450 µL tampon de extracción) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28°C antes de proceder con el pasos (paso no. 3).
- Dispositivo CALEX® Cap:
- Después de la extracción, dejar que el extracto de heces asiente durante 10 minutos con la cabeza blanca del dispositivo hacia abajo. Desenrosque la tapa de color azul. El sobrenadante se puede utilizar sin dilución adicional en el ensayo de flujo lateral.

3. **Procedimiento de ensayo de flujo lateral y lectura de los resultados:**

   Dos métodos alternativos se pueden cargar desde la tarjeta chip RFID respectiva. B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720. Seleccione una de las tarjetas con chip RFID antes de comenzar los experimentos. Cargue el método de prueba de la tarjeta de chip RFID.

3.1. Método <B-CALE-RCC720> con cronómetro interno

- Use la tarjeta de plástico verde.
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Añada 60 µl de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Cierre el portacasetes e inicie la medición pulsando el botón de inicio.
- El barrido se inicia automáticamente pasados 12 minutos (720 segundos).

3.2 Método <B-CALE-RCC> sin cronómetro interno

- Use la tarjeta de plástico blanca
- Añada 60 µl de muestra de heces diluida en el puerto de carga de muestra del casete de prueba.
- Incube la muestra durante 12 minutos +/- 1 minuto (arranque un cronómetro manualmente).
- Cargue el casete de prueba en el portacasetes de prueba del lector.
- Inicie el barrido del casete con el lector Quantum Blue® Reader pulsando el botón de inicio (<ENTER>) inmediatamente.

Observación: Consulte el manual del lector Quantum Blue® Reader para conocer sus funciones básicas y saber cómo ponerlo en marcha y manejarlo, especialmente cómo seleccionar métodos de prueba y cómo cargar parámetros específicos del lote desde la tarjeta chip RFID para llevar a cabo análisis de las muestras.

CONTROL DE CALIDAD

- Si la precisión del análisis no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye los errores en la técnica, compruebe los siguientes puntos: i) pipeteado, control de la temperatura y tiempo; ii) fechas de caducidad de los reactivos, y iii) condiciones de conservación e incubación.
- La autocomprobación (calibration check) del dispositivo Quantum Blue® que se realiza tras encender el lector tiene que ser válida.

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para la obtención de un resultado válido de la prueba, la línea control (C) debe ser visible en cualquier caso (véanse las figuras 1A y 1B). Se usa sólo como control funcional de la prueba y no puede usarse para la interpretación de la línea de test (T). Si la línea de test (T) no es detectable después de 12 minutos de incubación (figura 1A), no hay cantidades detectables de calprotectina presentes en la muestra de heces. Si la línea de test (T) es detectable después de 12 minutos de incubación (figura 1B), la cantidad de calprotectina presente en la muestra de heces se calcula mediante el lector Quantum Blue®.
- Si sólo la línea de test (T) es detectable después de 12 minutos de tiempo de incubación (figura 1C), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.
- Si ni la línea control (C) ni la línea de test (T) se detectan después de 12 minutos de tiempo de incubación (figura 1D), el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.
- Como el lector Quantum Blue® permite la evaluación cuantitativa de las líneas de test (T) y control (C), se realiza una validación adicional de la validez de la línea control (C). Si la intensidad de la línea control (C) es inferior a un umbral después de 12 minutos de tiempo de incubación, el resultado de la prueba no es válido y el análisis de calprotectina debe repetirse con un cartucho de prueba nuevo.

ESTANDARIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- El análisis de flujo lateral se calibra con BÜHLMANN fCAL™ ELISA (código para pedidos: EK-CAL).
- El lector Quantum Blue® de BÜHLMANN utiliza una curva estándar, específica del lote, para calcular la concentración de calprotectina. El rango de ensayo es entre 30 y 1000 µg/g.
- Para obtener resultados cuantitativos, muestras con concentraciones por encima de 1000 µg/g pueden repetirse con el ensayo BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range assay (código: LF-CHR25).

LIMITACIONES

- Los reactivos incluidos en este kit están optimizados para medir calprotectina humana en muestras de heces extraídas.

- Los valores de calprotectina fecal deben utilizarse como datos complementarios para ayudar al médico a establecer un diagnóstico.
- Los resultados de análisis de calprotectina obtenidos con el ensayo rápido BÜHLMANN Quantum Blue® para calprotectina pueden confirmarse midiendo otros biomarcadores (como la proteína C reactiva) o repitiendo el análisis de calprotectina BÜHLMANN fCAL™ ELISA (o utilizando un segundo cartucho de análisis) y comparándolos con el índice CDAI y el estado clínico del paciente antes de tomar cualquier decisión clínica y/o terapéutica.
- Durante el seguimiento de una terapia, los resultados de análisis de calprotectina obtenidos con el ensayo rápido BÜHLMANN Quantum Blue® Extended para calprotectina pueden interpretarse comparándolos con los resultados previos y en el contexto del cuadro clínico del paciente.

VALORES ESPERADOS

El cálculo de la calprotectina fecal es una manera fiable y sencilla de distinguir las enfermedades intestinales orgánicas de las funcionales. Se establecieron los siguientes datos con el ELISA de calprotectina de BÜHLMANN fCAL™ (código para pedidos: EK-CAL). En un estudio clínico, se investigó a 401 pacientes consecutivos sintomáticos, programados para una colonoscopia (Table 18). El examen endoscópico mostró a 273 pacientes con enfermedades funcionales, mientras que 128 pacientes sufrían diversas enfermedades orgánicas (colitis, enfermedad de Crohn, ulceración, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer o enfermedades inflamatorias).
El análisis de la curva ROC (AUC: 0,935) dio como resultado un valor umbral óptimo de 50 µg/g. Al aplicar este valor umbral, se puede alcanzar una sensibilidad clínica del 84,4% y una especificidad del 94,5% en la diferenciación entre enfermedades orgánicas y funcionales. El valor limite sugerido para los adultos (< 50 µg/g) puede usarse en los niños de 4 a 17 años, con independencia del sexo (ref. 7). Si bien las concentraciones fecales de calprotectina en los adultos y los niños son comparables, las concentraciones de los recién nacidos pueden estar significativamente aumentadas (ref. 6).

Valores por debajo de 50 µg/g:
Estos valores de calprotectina <50 µg/g no son indicativos de inflamación del tracto gastrointestinal. No es probable que pacientes con niveles bajos de Calprotectina fecal precisen de procedimientos invasivos adicionales para determinar la causa de la inflamación (ref. 4).

Valores elevados entre 50 µg/g y 200 µg/g:
Los valores de calprotectina entre 50 µg/g y 200 µg/g pueden ser representativos de un trastorno orgánico leve. La baja respuesta inflamatoria mostrada dentro de ese intervalo puede sugerir la repetición de la medida y la realización de investigaciones adicionales.

Valores elevados por encima de 200 µg/g:
Los valores de calprotectina > 200 µg/g son indicativos de un trastorno orgánico activo con inflamación del tracto gastrointestinal. Sugieren llevar a cabo investigaciones adicionales apropiadas y procedimientos curativos por parte de especialistas.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite para el blanco (LoB): <20 µg/g de calprotectina.

Límite de Detección (LoD): <30 µg/g de calprotectina.

Límite de Cuantificación (LoQ):
LoQ inferior: ≤30 µg/g de calprotectina
LoQ superior: ≥1000 µg/g de calprotectina

El LoQ se ha establecido a partir de 14 extractos de heces. En la Figure 2 se muestra el perfil de precisión resultante. El límite de cuantificación corresponde a la concentración de calprotectina con una imprecisión inferior a 25% CV, permitiendo mediciones cuantitativas en el rango de 30 (LoQ inferior) a 1000 µg/g (LoQ superior).

Linealidad: Los resultados mostraron linealidad dentro del rango de medición indicado de 30 a 1000 µg/g del ensayo Quantum Blue® Calprotectina Extended para la totalidad de muestras.

Recuperación de cantidades añadidas: La linealidad varía entre 90.6 y 101.8 %.

Repetibilidad: 20.1% CV. La repetibilidad del ensayo Quantum Blue® Calprotectina Extended se calculó a partir de 8 muestras de heces. En la Table 19 se presentan los valores medios de tres lotes diferentes de casetes de análisis. La respetabilidad del ensayo de las muestras varía entre 17.9 y 23.9 % CV.

Precisión interlote: 20.8% CV. La precisión interlote del ensayo Quantum Blue® Calprotectina Extended se calculó a partir de 8 muestras de heces extraídas que contenían entre 30 y 1000 µg/g de calprotectina. Los datos interlote de las muestras variaron entre 16.1 y 24.1% CV.

Comparación de métodos: R^2 = 0.94; y=1.05-3.91 µg/g. Se analizaron 50 extractos de heces que presentaban concentraciones de calprotectina dentro del rango de medición indicado del ensayo Quantum Blue® Calprotectina Extended y se compararon los resultados con los valores obtenidos con el método ELISA para calprotectina de BÜHLMANN fCAL™ (código para pedidos: EK-CAL). Los datos de correlación se ilustran en la Figure 3.

PORTUGUÊS

APLICAÇÃO DO TESTE

O BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectina Extended é um imunoensaio desenhado para a determinação quantitativa de valores de calprotectina em fezes humanas (ref. 1-6) a ser utilizado em combinação com o leitor BÜHLMANN Quantum Blue®. Para uso profissional*.
*Canada, Taiwan: só para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste permite a determinação quantitativa do antigénio da calprotectina mediante um imunoensaio tipo sanduiche.
A membrana do teste é revestida com um anticorpo de captura monoclonal (mAB) altamente específico para a calprotectina. Um segundo anticorpo de detecção monoclonal conjugado com ouro coloidal encontra-se na zona de dispensação e liberta-se aquando da adição do extrato diluído da amostra de fezes.
O complexo calprotectina/anti-calprotectina conjugado com ouro coloidal liga-se ao anticorpo monoclonal anti-calprotetctina que reveste a membrana do teste (linha do teste) e o conjugado anti-calprotectina com ouro coloidal livre liga-se ao anticorpo de cabra que reveste a membrana (linha de controle). As intensidades dos sinais da linha de teste e de controle são quantificadas pelo leitor BÜHLMANN Quantum Blue®.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Observações
Cassete do Teste	25 unidades	B-LFCALUS-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de Extração	1 frasco 125 ml	B-CAL-EX	Pronto para uso
Cartão Chip RFID	1	B-CALE-RCC	Cartão de plástico **branco**
Cartão Chip RFID	1	B-CALE-RCC720	Cartão de plástico **verde**

Table 16

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Tubos de extração

Os tubos de extração de fezes descritos abaixo não são incluídos no kit, e **devem ser encomendados separadamente**.

Dispositivo CALEX® Cap	50 ou 200 dispositivos com 5 mL tampão de extração, pronto para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubos, consistindo de espátulas e tampas	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubos: consistindo de tubo, suporte do dosador & dosador com 1,3 mL de tampão de extração, pronto para uso	B-CAL-SO50

Table 17

Controles

Os controles para o Quantum Blue® LF-CAL25 da BÜHLMANN podem ser encomendados em separado.

Controlos baixo* / elevado*	2 frascos, 0.5 ml	B-CALE-CONSET	Pronto para uso

Table 18

* a concentração dos controles é específica para cada lote

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Todos os componentes do kit são estáveis a 2-8ºC até à data de expiração impressa nos rótulos.

PRECAUÇÕES

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

- Nenhum reagente deste kit contém componentes de origem humana.
- Amostras dos doentes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais.
- As soluções não utilizadas devem ser eliminadas de acordo com a Regulamentação das Entidades Governamentais Locais.

PRECAUÇÕES TÉCNICAS

Componentes do kit

- Todos os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente (18-28°C) antes do início do ensaio.
  Misture bem (vortex) os reagentes antes de usar.
- Componentes não podem ser utilizados após data de expiração impressa nos rótulos.
- Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Os cassetes dos testes não podem ser re-utilizados.

Procedimento do teste

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.
- O leitor Quantum Blue® tem que ser ligado e programado para o uso do kit Quantum Blue® Calprotectin: B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720, antes do início do teste (ver manual do Leitor Quantum Blue®).
- Utilize o cartão branco RFID para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de doentes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados erróneos.
- De forma a obter resultados quantitativos viáveis é importante homogeneizar totalmente o amostra no tubo de extração.
- As amostras diluídas devem ser usadas dentro de poucas horas e não devem ser armazenadas por um período de tempo muito longo.
- É importante centrifugar os extratos com Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ antes do armazenamento (5 min a 3.000 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo. Com Cap CALEX® dispositivo pode armazenamento os extratos diretamente com o dispositivo. Para reutilização / re-medição dos extratos consulte o passo 2 no capítulo Procedimento de Ensaio.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECEDOS

- Vortex para extração das fezes
- Pipetas com pontas descartáveis: 10-200 µL e 1 mL
- Centrífuga
- Tubos de propileno ou poliestereno 5 mL para diluição do extrato
- Relógio/cronómetro
- Leitor Quantum Blue® disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Se os tubos de extração utilizados forem os mencionados na Table 17, é necessário menos de 1g de fezes.
Colha as amostras de fezes em tubos limpos e armazene refrigerado a 2-8 ºC até 6 dias. O extrato é estável ≥ 7 dias a temperatura 2-8 °C e ≥ 24 meses a temperatura ≤ - 20ºC.
Importante: A amostra tem que ser colhida em tubos sem qualquer aditivo químico ou biológico.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

1. **Extração das amostras de fezes**:
   O procedimento de extração está descrito nas instruções de uso fornecidas com os tubos de extração.
2. **Processamento de amostras:**
- Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 µL do extrato e 450 µL de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28° antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).
- Dispositivo CALEX® Cap: Depois da extração, deixar sedimentar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo, abrir a tampa azul. O sobrenadante pode ser utilizado sem qualquer diluição adicional com o ensaio de escoamento lateral.
3. **Procedimento de imunocromatografia e leitura:**
   Dois métodos alternativos podem ser carregados a partir do respectivo cartão chip RFID. B-CALE-RCC ou B-CALE-RCC720. Selecione um dos cartões com chip RFID antes de iniciar os experimentos. Coloque o método de teste a partir da RFID Chip Card.

3.1. Método <B-CALE-RCC720> com cronómetro interno

- Use o cartão de plástico verde.
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Feche o dispositivo do cassete no leitor e inicie a medição pressionando ENTER (<START>).
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 12 minutos (720 segundos).

3.2. Método <B-CALE-RCC > sem cronómetro interno

- Use o cartão de plástico brancho.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes diluído no cassete do teste.
- Incube durante 12 minutos +/- 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do leitor.
- Precione ENTER (<START>) no leitor Quantum Blue® para fazer a leitura da cassete.

Nota: Por favor, leia as instruções do Manual do Leitor Quantum Blue® Reader para conhecer as funções, iniciar e operar o leitor; especialmente como selecionar métodos e introduzir os parâmetros através da leitura do cartão RFDI.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Se a precisão do teste não se correlacionar com os limites estabelecidos e as repetições excluírem erros técnicos, verifique o seguinte: i) pipetagem, temperatura e tempos dos diferentes passos, ii) data validade dos reagentes e iii) condições armazenamento e incubação.
- A autocalibração do leitor Quantum Blue® (calibration check) quando é iniciado tem que ser válida.

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Num resultado válido, a Linha de Controlo (C) tem que ser sempre visível (ver Figuras 1A e 1B). É um teste de controle/validação que não pode ser usado para interpretar a Linha de Teste (T). Se a Linha de Teste (T) não for detectável após os 12 min de incubação (Figura 1A), a concentração de calprotectina presente na amostra é inferior ao limite de detecção. Se a Linha de Teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (Figura 1B), a concentração da calprotectina presente é calculada pelo leitor Quantum Blue®.
- Se apenas a Linha de Teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (Figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de calprotectina tem que ser repetido com outro cassete.
- Se nem a Linha de Controle (C) nem a Linha de Teste (T) forem detectáveis após 12 min de incubação (Figura 1D), o resultado do teste é inválido e o teste tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o leitor Quantum Blue® permite a avaliação quantitativa das Linhas de Teste (T) e de Controlo (C), há uma validação adicional da Linha de Controle (C). Se a intensidade do sinal da Linha de Controle (C) for inferior à determinada para esse lote após os 12 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de calprotectina tem que ser repetido com outro cassete.

CALIBRAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

- O teste de imunocromatografia está calibrado de acordo com a BÜHLMANN fCAL™ ELISA (referência: EK-CAL).
- O leitor BÜHLMANN Quantum Blue® utiliza uma curva de calibração específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. A gama de calibração varia de 30 a 1000 µg/g.
- Para medições quantitativas,amostras desconhecidas com leituras superiores de 1000 µg/ g podem ser re-testadas no Quantum Blue® Calprotectina High Range BÜHLMANN (referência: LF-CHR25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit estão otimizados para quantificar a calprotectina humana em extratos de amostras de fezes.
- Os valores de calprotectina Fecal podem ser utilizados pelo clínico como dado adicional no estabelecimento do diagnóstico.
- O resultado do teste da calprotectina obtido com o BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin pode ser confirmado com outros biomarcadores (p.e. Proteína C reactiva) ou por repetição da calprotectina BÜHLMANN fCAL™ ELISA (ou utilizando um segundo cassete) e comparado com o *score* CDAI e o estado clínico do doente antes de qualquer tomada de decisão clínica e/ou terapêutica.
- Durante a monitorização terapêutica, o resultado do teste da calprotectina o teste BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Extended pode ser interpretado por comparação com resultados anteriores e com o contexto clínico do doente.

VALORES ESPERADOS

Calculando a calprotectina fecal é uma maneira confiável e simples de distinguir doenças intestinais funcionais orgânicos. As informações a seguir com BÜHLMANN fCAL™ ELISA (código EK-CAL) foram estabelecidos. Em um estudo clínico, 401 pacientes sintomáticos consecutivos programados para colonoscopia (Table 18) foi investigada. O exame endoscópico mostrou 273 pacientes com distúrbios funcionais, enquanto 128 pacientes que sofrem de várias doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, ulceração, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças inflamatórias).

Análise ROC (AUC: 0,935) Curva resultou num valor de limiar óptimo de 50 g/g. Ao aplicar este limite, você pode chegar a uma sensibilidade clínica de 84,4% e uma especificidade de 94,5% na diferenciação entre doenças orgânicas e funcionais. O valor limite sugerido para adultos (<50 µg/g) podem ser utilizados em crianças com idade entre 4-17 anos, independentemente do sexo (ref. 7). Enquanto concentrações anticalprotectina fecais em adultos e crianças são semelhantes, as concentrações de recém-nascidos pode ser significativamente aumentada (ref. 6).

Valores inferiores a 50 µg/g:
Valores de calprotectina <50 µg/g não são indicativos da inflamação do trato gastrointestinal. Poderá levar-se em consideração continuar a vigiar o doente e retestar a amostra com o EK-CAL or LF-CAL (ref. 4).

Valores elevados entre 50 e 200 µg/g:
Valores de calprotectina entre 50 e 200 µg/g podem significar uma doença leve orgânica como inflamação do trato gastrointestinal. A fraca resposta inflamatória nesta gama sugere a repetição da quantificação e outras investigações.

Valores elevados superiores a 200 µg/g:
Valores de calprotectina >200 µg /g são indicativos de doença orgânica ativa com inflamação do trato gastrointestinal. Sugerem-se investigações adicionais a indicar pelos especialistas.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Limite do Branco (LoB): <20 µg/g calprotectina.

Limite de Detecção (LoD): <30 µg/g calprotectina.

Limite de Quantificação (LoQ):
LoQ inferior: ≤30 µg/g calprotectina
LoQ superior: ≥1000 µg/g calprotectina
O LoQ é estabelecida a partir de 14 extratos de fezes. Na Figura 2, o perfil resultante é apresentada com precisão. O limite de quantificação corresponde à concentração de calprotectina em uma imprecisão inferior a 25% CV, permitindo medições quantitativas na gama de 30 (inferior LOQ) de 1000 ug / g (mais elevado LOQ).

Linearidade: Os resultados mostraram linearidade na leitura da gama 30 a 1000 µg/g de ensaio Quantum Blue® Calprotectina Extended para todas amostras.

Recuperação de quantidades adicionadas: A recuperação varia entre 90.6 e 101.8%.

Repetição: 20.1% CV. La repetibilidade del ensaio Quantum Blue® Calprotectina Extended são calculados de 8 amostras de fezes. Na Tabela 19, os valores médios a partir de três lotes diferentes de análises são apresentados cassetes. Respeitabilidade ensaio amostras varia entre 17.9% e 23.9% CV.

Precisão Inter-lote: 20.8% CV. A inter-monte Quantum Blue® Calprotectin Extended ensaio foi calculada para calprotectina a partir de 8 de fezes amostras contendo entre 30 e 1000 µg/g de calprotectina. As inter-lot amostras de dados variou entre 16.1% e 24,1% CV.

Método comparativo: R^2 = **0.94; y=1.05-3.91 µg/g**. 50 indivíduos testados que tinham níveis anticalprotectina dentro da faixa de medição do ensaio indicado Quantum Blue® Calprotectin Extended para calprotectina, foram analisados e os resultados com os valores obtidos por ELISA para calprotectina BÜHLMANN fCAL™ (código de EK-CAL) foram comparados. Os dados de correlação são mostrados na Figura 3.

TABLES AND FIGURES/ TABELLEN UND ABBILDUNGEN/ TABLES ET FIGURES/ TABELLE E FIGURE/ TABLAS E FIGURAS

Figure 1 **Test Results**

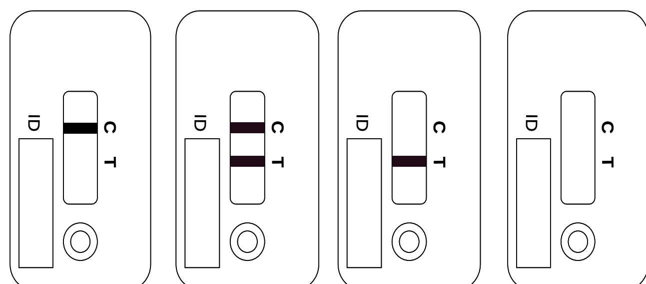


Figure 2 **Precision Profile**

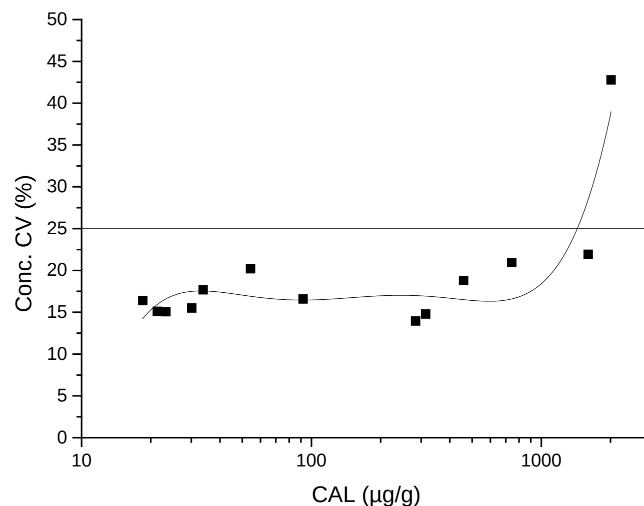


Table 18 **Clinical Study**

	Calprotectin (EK-CAL)	Lactoferrin
n	401	391
cut-off	50 µg/g	3 µg/ml
Sensitivity	84.4%	74.2%
Specificity	94.5%	91.0%
PPV	87.8%	79.3%
NPV	92.8%	88.4%
LR+	15.4	0.17
LR-	8.25	0.28

Figure 3 **Method Comparison**

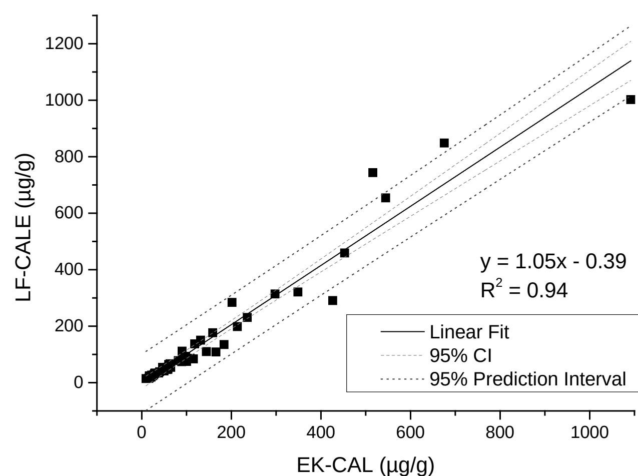


Table 19 **Precision (Repeatability)**

Sample No.	Calprotectin Concentration [mean µg/g]	Repeatability [CV]
Smpl 1	24.2	23.5%
Smpl 2	32.9	18.7%
Smpl 3	51.0	17.9%
Smpl 4	93.7	18.3%
Smpl 5	298.7	19.7%
Smpl 6	305.9	18.2%
Smpl 7	509.7	23.9%
Smpl 8	662.1	20.6%

1. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol **123**, 450-460 (2002)
2. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality.* Lancet **356**, 1783-4 (2000)
3. Tibble JA *et al*.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease.* Gut **47**,506-513 (2000).
4. Tschanguizi et al.: *Stool Calprotectin as a Marker of inflammation.* Poster at UEGW, 2007
5. Hessian PA and Fisher L: *The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure*. Eur J Biochem 268, 353-63 (2001).
6. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis **12(6)**, 524-34 (2006)
7. Fagerberg UL et al.: Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
8. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E*. Measurement of calprotectin in faeces*.. Tidsskr Nor Legeforen **128**, 743–5 (2008)

APPENDIX III

SYMBOLS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Validade até
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung No. du lot No. del lotto No. de lote No. do lote
IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical Device *In Vitro* Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic *in vitro* Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* Produto para Diagnóstico *in vitro*
Σ	Content sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n" tests Contenuto sufficiente per „n" saggi Contenudo sufficiente para <n> ensayos Conteúdo suficiente para <n> testes

Symbol	Explanation
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Consultar as intruções de uso
TC	Test Cassette Test Kassette Cassette de testi Card di rilevazione Cartucho de prueba Cassete de teste
BUF EX	Extraction Buffer Extraktionspuffer Tampon d'extraction Tampone di estrazione Tampón de extracción Tampão de extração
RCC	RFID Chip card RFID Chipkarte RFID Carte à puce RFID Carta chip RFID Tarjeta chip RFDI Cartão Chip
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Limite de temperatura




Zertifiziertes Managementsystem
SQS
ISO 9001 / ISO 13485


IVD